

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И СТАНДАРТИЗАЦИИ

УДК 542.98:615.322
© Коллектив авторов

ВЭЖХ АНАЛИЗ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА В ЭКСТРАКТАХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

П.Б. Цыдендамбаев^{1*}, Б.С. Хышиктүев¹, А.А. Дутов¹,
С.М. Николаев², А.В. Савин³

¹Читинская государственная медицинская академия, 672090, г.Чита,
ул. Горького, 39а; тел. (факс): 8-3022-32-30-58; эл. почта: macadem@mail.chita.ru

²Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ

³ООО НЦПИ "Биотехпром", Москва

В работе представлен способ определения флавоноида дигидрокверцетина в экстрактах лекарственных растений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Метод отличается простотой, относительной быстротой определения вещества, высокой воспроизводимостью и может быть широко применен в фитофармакологии.

Ключевые слова: ВЭЖХ, дигидрокверцетин, экстракты лекарственных растений.

ВВЕДЕНИЕ. Дигидрокверцетин (3,5,7,3',4'-пентагидрокси-флаванон) (ДКВ) – биологически активное соединение, основным промышленным источником которого является древесина лиственницы сибирской (*Larix sibirica*). Данное вещество также известно под названием таксифолин, так как ранее оно было выделено из коры дугласовой пихты (*Pseudotsuga taxifolia*) [1]. ДКВ обладает широким спектром биологической активности: антидиабетической [2], противоопухолевой [3, 4], противоаллергической и противовоспалительной [5, 6], низкими мутагенной активностью и токсичностью [7]. ДКВ является более активным и стабильным антиокислителем, чем токоферолы и каротиноиды. Данное соединение тормозит процессы перекисного окисления липидов клеточных мембран, препятствуя их разрушению, оказывает капилляропротекторное действие, а также обладает антиатерогенным свойством, уменьшает риск возникновения инфарктов и инсультов [8]. При его применении наблюдаются улучшение коронарного кровотока, сократимости миокарда, нормализация возбудимости и проводимости [9]. Показана эффективность его применения в комплексной терапии ревматизма, септического эндокардита и вегетососудистой дистонии [10, 11].

Важнейший вывод, сделанный на основании фармакологических исследований, состоит в том, что ДКВ может играть протекторную роль в отношении развития кардиосклероза, особенно при сердечной недостаточности и инфаркте миокарда, а также защиты печени от различных видов поражения [12].

Для оценки его чистоты и количественного содержания в продуктах используются различные методы исследования, но наиболее чувствительным и быстрым является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).

*Адресат для переписки

Известен способ определения ДКВ методом Воскобойниковой и соавторов [13], однако данный способ имеет недостатки: 1) способ недостаточно чувствителен за счёт того, что в качестве одного из компонентов элюента используют водный раствор уксусной кислоты, который обладает высокой оптической плотностью и увеличивает соотношение сигнал/шум, что вызывает снижение точности определения ДКВ; 2) длительность проведения анализа за счёт того, что указанный компонент увеличивает вязкость элюента, что в свою очередь приводит к увеличению времени анализа, кроме того, снижается срок службы колонки за счёт создания высокого давления данным компонентом элюента. Также известен способ определения ДКВ, предложенный Храмовой [14], однако данный способ за счёт необходимости экстрагирования ДКВ на концентрирующем патроне “Диапак С16” удлиняет время исследования. Кроме этого, способ недостаточно чувствителен, так как в качестве элюента применяется 48%-й метанол, использование которого обуславливает широкие пики [15], что существенно затрудняет расчеты концентрации и снижает точность определения. В дополнение, при использовании подвижной фазы с большим содержанием метанола на колонке с диаметром 2 мм резко увеличивается давление, что неблагоприятно действует на колонку, уменьшая срок её службы.

Целью работы явилась разработка чувствительного и воспроизводимого метода определения ДКВ в экстрактах лекарственных растений.

МЕТОДИКА. Стандарт ДКВ предоставлен ООО НЦПИ “Биотехпром”, г. Москва. Базовый раствор стандарта (10 мг/мл) готовили на 0,01 М фосфатном буфере (pH 7,45), рабочий получали разбавлением базового до концентрации 100 мкг/мл. Сухие этилацетатные экстракты растений, полученные в лаборатории Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (г. Улан-Уде) методом Андреевой и соавторов [16] растворяли в том же буфере. Объем вводимого в петлю инжектора стандарта составил 2 мкл, пробы – 10 мкл. Анализ проводили с помощью хроматографа “Irica” (Япония) на обращенно-фазовой колонке 100×4 мм с Диасфер C₁₆ 5 мкм, 5000 ТТ (“БиоХимМак”, Москва) + предколонка с C₁₈ 4×3 мм (“Phenomenex”, США), в изократическом режиме с УФ-детекцией при 290 нм, элюент ацетонитрил – 0,0025 М NaH₂PO₄ (pH 3,0) – изопропанол (30:69:1, v/v), скорость потока 600 мкл/мин, давление 40 бар.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Предлагаемый способ отличается от вышеуказанных тем, что для анализа применяется этилацетатный экстракт растения, что позволяет получить экстракты особой чистоты и значительно продлить срок эксплуатации колонки. В нашем способе в качестве элюента мы использовали именно подобную смесь так как: а) применение ацетонитрила позволяет получать высокие и узкие пики, что повышает чувствительность и точность способа, а метанол обуславливает широкие “размытые” пики; б) изопропанол применяется в качестве стабилизатора времени удерживания, так как чем стабильнее время удерживания, тем специфичнее идентификация вещества. Параметры используемых фосфатного буфера и подвижной фазы (молярность, pH, соотношение) определены экспериментальным путем, при которых регистрируют максимальную точность и минимальное соотношение сигнал/шум, что позволяет улучшить предел детекции определяемого вещества.

Для регистрации хроматограмм использовался программно-аппаратный комплекс “Multichrom for Windows” (“Амперсенд”, Россия). Регистрировали пик и рассчитывали концентрацию ДКВ в экстракте по высоте пика стандарта. Время удерживания пика стандарта (200 нг) – 3,39±0,1 мин, высота – 19,7±1,3 мВ. Время удерживания пика ДКВ пробы - 3,43±0,5 мин, высота – 1,95±0,18 мВ (рисунок). Ширина пика стандарта – 0,4 мин, ширина пика в пробе – 0,5 мин, предел детекции – 10 нг/мл (сигнал/шум = 3). Конечная концентрация ДКВ в исследуемом образце составила 1,98±0,18 мкг/мл.

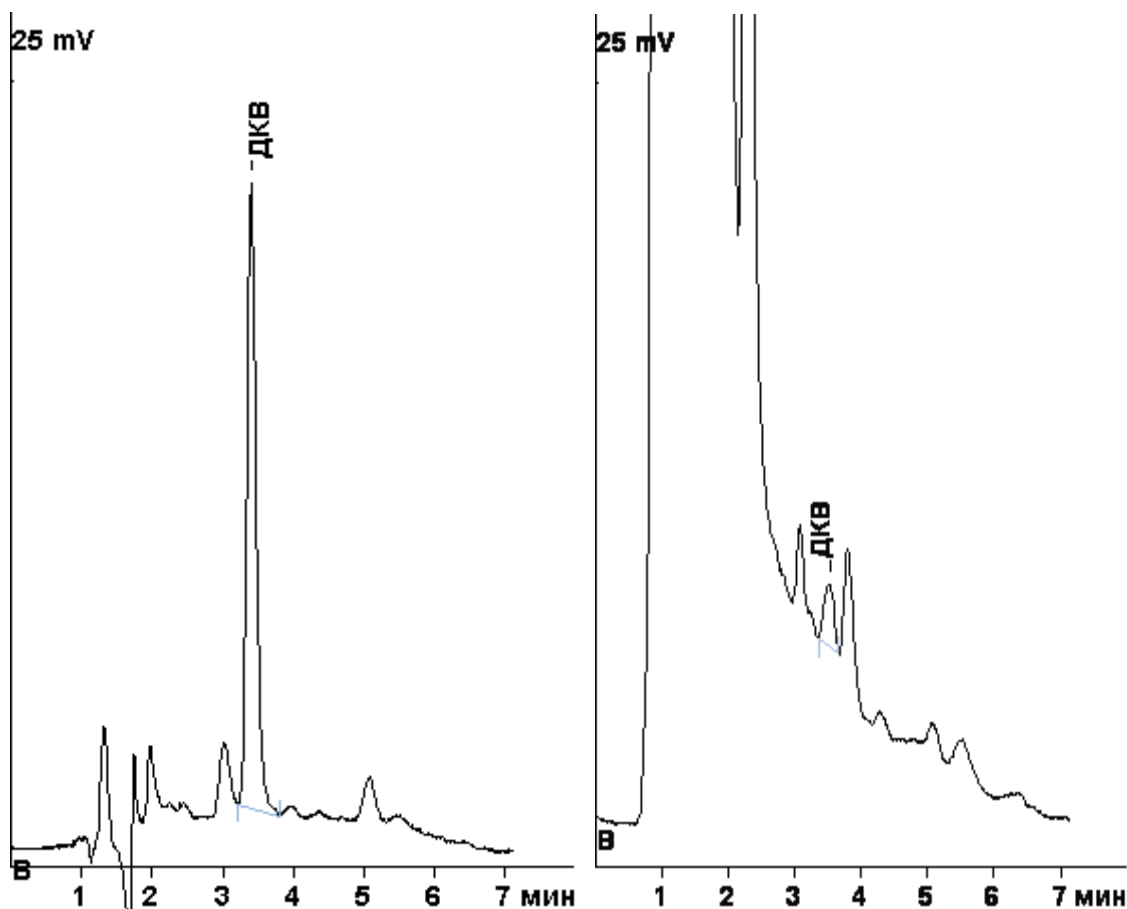


Рисунок.
Хроматограммы стандарта ДКВ 200 нг (слева) и пробы
экстракта клубней зопника клубненосного (справа).

Воспроизводимость способа оценивали по значению коэффициента вариации (V): $V = (S / \bar{X}) \cdot 100\%$, где S – среднее квадратическое отклонение, \bar{X} – средняя арифметическая. Коэффициент вариации (V) способа составил 9,1%.

Таким образом, предлагаемый способ (заявка на изобретение “Способ определения дигидрокверцетина” № 2006124017 от 04.07.2006) является точным, быстрым, нетрудоемким и обладает высокой воспроизводимостью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонова Г.Ф., Тюкавкина Н.А. (1983) Химия древесины, №2, 89-96.
2. Haraguchi H., Ohmi I., Fukuda A., Tamura Y., Mizutani K., Tanaka O., Chou W.H. (1997) Biosci. Biotechnol. Biochem. **61**(4), 651-654.
3. Chu S.C., Hsieh Y.S., Lin J.Y. (1992) J. Nat. Prod. **55**(2), 179-183.
4. Kandaswami C., Perkins E., Drzewiecki G., Soloniuk D.S., Middleton E.Jr. (1992) Anticancer. Drugs, **3**(5), 525-530.
5. Bronner C., Landry Y. (1985) Agents Actions, **16**(3-4), 147-151.
6. Schwarz A., Middleton E.Jr. (1984) Immunopharmacology, **7**(2), 115-126.

АНАЛИЗ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА В ЭКСТРАКТАХ РАСТЕНИЙ

7. *Jurado J., Alejandre-Duran E., Alonso-Moraga A., Pueyo C.* (1991) *Mutagenesis*, **6**(4), 289-295.
8. *Кольхир В.К., Тюкавкина Н.А., Быков В.А. и др.* (1995) *Хим.-фарм. ж.*, №9, 61.
9. *Кравченко Л.В., Морозов С.В., Авреньева Л.И., Бабкин В.А., Тутельян В.А.* (2005) *Токсикол. вестник*, №1, 14-20.
10. *Тарасова Е.А.* (1999) *Практ. фитотерапия*, №1, 37-41.
11. *Тюкавкина Н.А., Руленко И.А., Колесник Ю.А. и др.* (1997) *Акт. пробл. создания новых лекарственных препаратов природного происхождения*, Выборг, 67-71.
12. *Тюкавкина Н.А., Руленко И.А., Колесник Ю.А.* (1997) *Вопр. питания*, №6, 12-15.
13. *Воскобойникова И.В., Геодакян С.В., Тюкавкина Н.А., Остроухова Л.А., Колесник Ю.А., Бабкин В.А.* (1992) *Фармация*, №6, 74-75.
14. *Храмова Е.П.* (2004) *Мат-лы VII конф. "Аналитика Сибири и Дальнего Востока-2004"*, с. 154.
15. *Хефتمان Э.* (1986) *Хроматография: практическое приложение метода* (пер. с англ.); в 2 частях, Мир, М.
16. *Андреева Т.И., Комарова Е.Н., Юсубов М.С., Короткова Е.И.* (2004) *Хим.-фарм. ж.*, **38**(10), 26-28.

Поступила: 25. 09. 2006.

HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF DIHYDROQUERCETIN IN EXTRACTS OF MEDICINAL PLANTS

P.B. Tsydendambaev¹, B.S. Khyshiktuev¹, A.A. Dutov¹, S.M. Nikolaev², A.V. Savin³

¹Chita State Medical Academy, Gorkogo ul., 39a, Chita, 672090 Russia; tel. (fax): 8-3022-32-30-58;
e-mail: macadem@mail.chita.ru

²Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences,
Ulan-Ude, Russia

³Biotechprom, Ltd., Moscow, Russia

Determination of dihydroquercetin in extracts of medicinal plants by a high-performance liquid chromatography is presented. The method is simple, quick, highly reproducible and can be widely applied in phytopharmacology.

Key words: HPLC, dihydroquercetin, extracts of medicinal plants.